Zahnmed 191

Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
zu Hamburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt

Die saprophytischen Neisserien der Mundhöhle:

Untersuchungen über ihre Eigenschaften und Charakterisierung der Arten.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von Brigitte Böger geb. Wulff aus Hamburg

Hamburg 1962

1962

Aus der Universitätsklinik für Zahn-
Mund- und Kieferkrankheiten
zu Hamburg

Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Schuchardt

Die saprophytischen Neisserien der Mundhöhle:

UNTERSUCHUNGEN ÜBER IHRE EIGENSCHAFTEN UND CHARAKTERISIERUNG DER ARTEN.

[illegible]

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Brigitte Böger geb. Wulff
aus Hamburg

Hamburg 1962

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am : 1.8.1962

gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Dekan: Professor Dr. G. Matthes
Referent: Privatdozent Dr. U. Berger
Korreferent: Professor Dr. Dr. K. Schmidt

Inhalt

	Seite
Einleitung	2
I. Untersuchungsmethoden	11
II. Ergebnisse	14
1. Untersuchte Eigenschaften	
a) Wachstumsansprüche	14
b) Koloniemorphologie	14
c) Pigmentbildung	15
d) Hämolyse	16
e) Cytochromoxydase	16
f) Peroxydase	16
g) Katalase	17
2. Diagnose und Unterscheidung der einzelnen Arten	17
III. Diskussion	24
Zusammenfassung	29
Literatur	30
Lebenslauf	32

Einleitung

Bis heute ist in der Fachliteratur noch immer keine endgültige Klarheit über die charakteristischen Eigenschaften der saprophytischen Neisserien geschaffen worden. Es sind auch relativ wenige Arbeiten auf diesem Gebiet veröffentlicht worden, und die meisten liegen mehr als 30 Jahre zurück.

GHON und PFEIFFER (1902) führten als erste an 40 Stämmen der einzigen bis dahin bekannten saprophytischen Art, N. catarrhalis, bakteriologische Untersuchungen durch. Sie stellten ein Wachstumsoptimum von 37°C fest und beobachteten eine untere Wachstumsgrenze bei 18°C. Bei einer Temperatur zwischen 18°C und 20°C fanden sie eine sichtbare Entwicklung der Kolonien erst nach fünf bis sechs Tagen. Die von ihnen beschriebenen Stämme bildeten rundliche Kolonien, deren Rand unregelmäßig war und deren Farbe von weißlich-grau nach gelblich-braun wechselte.

Schon einige Jahre später gelang es von LINGELSHEIM (1906), auf den nach ihm benannten zuckerhaltigen Ascites-Lackmusnährböden einige neue Arten zu beschreiben. Er unterschied 5 Arten. Der schon bekannte M. catarrhalis wurde erneut beschrieben, wobei die von GHON u. PFEIFFER gemachten Beobachtungen bestätigt wurden. Eine der neuentdeckten Arten war der Diplococcus pharyngis siccus, der

trockene, feste Kolonien bildete, deren Oberfläche stark gerunzelt war. Die besten Wachstumsbedingungen waren auf Blutagar gegeben.

Neben diesen beiden Arten fand von LINGELSHEIM noch 3 verschiedene Arten, die er Diplococcus flavus I, Diplococcus flavus II und Diplococcus flavus III nannte. Die beiden ersten Arten unterschieden sich kulturell und waren außerdem leicht durch die Agglutination zu trennen, obwohl sie die gleichen Zucker vergoren, und zwar Glukose, Maltose und Lävulose. Beide Arten bildeten ein gelb-grünliches Pigment.

Der Diplococcus flavus III wurde aus Mandelabstrichen bei Angina gezüchtet. Die Kolonien zeigten bei der Isolierung schlechtes Wachstum auf Agar und die Pigmentbildung war nur schwach zu erkennen.

ELSER und HUNTOON (1909) untersuchten 114 Stämme. Auch sie teilten die Neisserien, wie von LINGELSHEIM, in 5 Arten ein. Jedoch waren die Ergebnisse nicht immer die gleichen.

64 Stämme gehörten zum M.catarrhalis. Diese Art erschien in zwei Typen, von denen der Typ I häufiger als Typ II zu finden war. Dabei war festzustellen, daß entweder beide Typen auf der Originalplatte nebeneinander auftraten, oder daß eine zunächst als Typ I erschienene Kolonie bei weiterem Überimpfen auf eine neue Ascites-Agar-Platte als Typ II zu erkennen war. (Keiner der getesteten Zucker wurde vergoren.)

Nur 2 Stämme wurden als M. pharyngis siccus identifiziert. Diese Art zeigte mit der von V. LINGELSHEIM beschriebenen Übereinstimmung bis auf die Reaktion gegenüber Saccharose, die hier vergoren wurde und bei von LINGELSHEIM nicht.

Die bisher ausführlichste Untersuchung führte GORDON (1921) durch. Er untersuchte gram-negative Kokken bei Erkältungen und Grippe, wobei er dem M. catarrhalis besondere Aufmerksamkeit widmete.

Im Verlauf der Versuchsserie wurden insgesamt 502 Stämme auf acht verschiedenen Zuckernährböden gezüchtet und auf ihre Fermentreaktionen geprüft. Bei der großen Anzahl der Stämme ist aber zu berücksichtigen, daß viele doppelt erschienen, obwohl nur Kolonien mit sichtbaren Wachstumsunterschieden überimpft wurden.

GORDON unterschied zwei Hauptgruppen. Die erste Gruppe, die keinen der getesteten Zucker vergor, bezeichnete er als M. catarrhalis-Gruppe. Durch kulturelle Unterschiede und morphologische Variationen ließ sich diese Gruppe in vier Untergruppen unterteilen. Eine fünfte Untergruppe verhielt sich in der Zuckerreaktion anders und wurde als M. catarrhalis-Untergruppe A bezeichnet. Alle fünf Untergruppen agglutimierten spontan in Kochsalzlösung.

Die zweite Hauptgruppe, deren Stämme im Gegensatz zu der ersten Gruppe alle pigmentiert waren, wurde als pigmentbildende Gruppe bezeichnet. Auch hier wurden Unter-

gruppen beschrieben, von denen fünf morphologisch und in den Wachstumsmerkmalen übereinstimmten. Nur eine Gruppe zeigte Abweichungen. Im allgemeinen erschienen die Kolonien als unregelmäßige, runde Scheiben mit mehr oder weniger zackigen Rändern. Mit kleinen Nuancen war das Pigment von grünlich-gelber Farbe.

Die Einteilung in sechs Untergruppen beruhte auf den unterschiedlichen Fermentreaktionen. Je eine kleinere Gruppe vergoren Dextrose, Dextrose + Lävulose und Dextrose + Maltose.

Eine größere Gruppe vergor drei der getesteten Zucker, und zwar Dextrose, Lävulose und Maltose.

Die größte Gruppe, die sich aus über der Hälfte der pigmentierten Stämme zusammensetzte, vergor Dextrose, Lävulose, Maltose und Saccharose.

Die sechste Gruppe verwertete Glukose, Maltose, Fructose, Saccharose, Galaktose und Laktose, sowie Dextrin und Mannit schwach.

Neben diesen beiden Hauptgruppen fand GORDON noch einige Stämme des M.pharyngis siccus und des Diplococcus crassus.

1928 erschienen zwei Arbeiten über gram-negative Kokken. Die erste veröffentlichte S.P. WILSON. Er untersuchte ungefähr 3000 Abstriche des Nasopharynx und erhielt dabei in mehr als 95 % der Fälle gram-negative Kokken.

Bei den Untersuchungen verwendete er 6 " Typ-Stämme" und fand, daß alle Saccharolyten waren. Offenbar waren 2 Perflava-Typen (A,C), 2 oder 3 Sicca-Typen (B,D) und 1 Flava-Subflava-Typ (F) dabei.

Der Zweck seiner Untersuchungen war einmal die Haltung verschiedener Stämme und Nachprüfung nach Intervallen auf Konstanz der Merkmale und zum anderen die Züchtung neuer Stämme, um eine Gruppierung zu versuchen.

Er untersuchte die Morphologie der Stämme, sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch, das Wachstum auf Nähragar, in Bouillon, auf Fildes-Agar bei 22°C und prüfte die Fermentreaktionen.

Allgemein konnte er mäßiges bis sehr gutes Wachstum auf Nähragar feststellen.

Die 6 "Typ-Stämme" bezeichnete er als Standardstämme A-F. Stamm A bildete S-Kolonien aus und wuchs entweder gering oder gar nicht bei 22°C.

Stamm B zeigte nach 24 Stunden S-Charakter mit gelegentlicher Zähnung, nach 48 Stunden radiäre Zeichnung. Das Wachstum bei 22°C war wie bei A.

Stamm C bildete gelbliche S-Kolonien und wuchs bei 22°C schlechter als A.

Stamm D zeigte weißliche Kolonien mit radiären Runzeln, oft war der Rand gezähnt. Bei 22°C war das Wachstum wie bei A.

Stamm E erschien in grau-weißen S-Kolonien und wuchs bei 22°C gar nicht. Dieser Typ verhielt sich wie der von v.INGELSHEIM mit Flavus I bezeichnete, ohne jedoch Pigment zu bilden.

Stamm F bildete klebrige, genabelte S-Kolonien und wuchs bei 22°C nicht.

Bei der Züchtung von 101 neuen Stämmen waren 97 dem normalen Nasopharyns entnommen, 4 Stämme aus dem Sputum von Patienten mit Lobärpneumonie isoliert worden. Davon gehörten 16 zum Meningococcus, 6 zu N.catarrhalis, 23 zum Standard-Stamm A, 17 zum Standard-Stamm B, 14 zum Stamm C, 10 zum Stamm D, 3 zum Stamm E und 18 waren nicht klassifizierbar.

Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen eine große Variabilität der Stämme. Die Standard-Stämme A und F zeigten einen Wechsel in der Koloniemorphologie von S nach R, die Stämme B und D von R nach S. Auch das Wachstum bei 22°C war bei den Stämmen A-D variabel und bei E und F negativ. Wegen dieser starken Variabilität der Merkmale war eine Klassifizierung mit den von früheren Autoren angegebenen Typen nicht möglich, es bestand immer nur teilweise Übereinstimmung.

WILSON nahm an, daß die gram-negativen Kokken in Meningokokken, N.catarrhalis und alle anderen Typen in eine Art mit drei Subspecies einzuteilen waren.

Die zweite im Jahre 1928 erschienene Arbeit war die von

G.S. WILSON und M.M. SMITH.

In dieser Arbeit wurden viele Stämme über kurze Zeit untersucht. Die Abstriche wurden von gesunden Versuchspersonen gewonnen und auf Fildes-Agar und Blutagar bebrütet. Insgesamt wurden 78 Stämme untersucht.

Konnten die Kulturen als rein angesehen werden, wurden sie auf Nähragar ausgestrichen, um Meningokokken auszuschließen. Alle Stämme, die auf diesem Nährboden gut wuchsen, wurden weiter untersucht.

Neben Säurebildung wurden die morphologischen Eigenschaften und die Pigmentbildung beobachtet.

Die Konsistenz der Kolonien war bei allen Stämmen ziemlich gleichmäßig: membranös, fest und sehr bröcklig.

15 der Stämme zeigten nach 48 Stunden Brutzeit R-Charakter und 62 erschienen in der S-Form. Nach 5 Tagen waren von den S-Kolonien nur noch 27 Stämme unverändert, während die anderen 35 in die R-Form umgeschlagen waren. Die Stämme, die R-Kolonien ausbildeten, blieben unverändert. Obwohl die Kolonien alle in frischem Zustand untersucht wurden, konnte niemals deutliche Pigmentbildung festgestellt werden.

Da zu den Resultaten anderer Autoren und auch bei den von WILSON und SMITH selbst durchgeführten Untersuchungen starke Diskrepanzen der Vergärungen bestanden, mußten die Autoren annehmen, daß sie kein zuverlässiges Mittel zur Differenzierung der gram-negativen Kokken

darstellten. Ebenso nahmen sie an, daß die Pigmentbildung wegen der großen Variabilität als Klassifizierungsmerkmal ausgeschlossen werden muß.

Auch die Unterschiede des Kolonieaspektes wurden nicht unbedingt als Beweis für die Verschiedenheit der Keime angesehen.

Die Autoren sahen zwei Möglichkeiten für die Klassifizierung der gram-negativen Kokken, wobei die eine Methode wissenschaftlicher und die andere praktischer war, beide jedoch nur als provisorisch angesehen werden konnten. Einmal konnte man die ganze Gruppe als eine Art zusammenfassen mit zahlreichen Varianten, zum anderen willkürlich Stämme aus der Skala herausnehmen und alle benachbarten dazuzählen.

Abschließend schlugen sie vor, alle gram-negativen Diplokokken des Nasopharynx, mit Ausnahme der Meningokokken, als N.pharyngis zusammenzufassen, N.catarrhalis inbegriffen.

Eine der letzten Veröffentlichungen über die Bakteriologie der Mundhöhle war die von MORRIS (1954).
Er untersuchte 87 Stämme und teilte sie in 30 Typen ein. Morphologisch unterschied er zwei Typen. Die Konsistenz der Kolonien war entweder schleimig, häutig oder bröcklig. Oxydase wurde bei 13 Stämmen nachgewiesen. Nur ein Typ bildete auf Blutagar freie Hämolyse, in einem anderen Fall war die Blutplatte lackfarben geworden. Mit

Ausnahme von 2 Typen, die ein grünes Pigment bildeten, wurde bei allen übrigen keine Pigmentation gesehen.

Auch MORRIS stellte zusammenfassend fest, daß die Neisserien eine heterogene Gruppe darstellen. Von anderen Autoren beschriebene Typen erkannte er wieder, jedoch fand er immer solche, die dazwischen lagen, Ebenso war auch ihm die große Variabilität der Arten aufgefallen.

TOPLEY und WILSON (1955) weisen in ihrem Standardwerk darauf hin, wie wenig bis dahin über die gram-negativen Kokken bekannt war, um sie einer exakten Klassifizierung unterziehen zu können. Die allgemein üblichen Untersuchungen beschränken sich im wesentlichen auf die Zuckerreaktionen, die serologischen Eigenschaften und die Pigmentbildung.

Nach Meinung der Autoren scheint eine Einteilung der gram-negativen Kokken des normalen Nasopharynx in einzelne Arten nicht gerechtfertigt. Sie unterscheiden lediglich N.flavescens, N.catarrhalis und möglicherweise N.sicca. Alle übrigen Typen fassen sie unter dem Namen N.pharyngis zusammen. Diese Art charakterisieren sie als gram-negativen Diplococcus, dessen Koloniemorphologie großen Variationen unterworfen ist und bei 37°C die günstigsten Wachstumsbedingungen hat, jedoch auch bei 22°C wächst. Das von dieser Art gebildete Pigment wechselte von gelb, gold-gelb bis grünlich-gelb.

Auch die in Bergey's Manual (1957) angegebene Klassifi-

zierung basiert auf sehr inkonstanten Merkmalen. Hier werden die Neisserien in zwei Hauptgruppen eingeteilt, von denen die eine Pigment bildet und die andere nicht. In die erste Gruppe gehören N.catarrhalis, wobei die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt werden, N.sicca und N.hämolysans, die beide Glukose, Maltose, Fruktose und Saccharose vergären und manchmal hämolysieren.

Die zweite, pigmentbildende Gruppe, umfaßt 2 Untergruppen. Die erste Gruppe vergärt keine Kohlehydrate. Dazu werden N.flavescens und N.caviae gezählt. Zur zweiten Gruppe werden N.subflava, die ein grünlich-gelbes Pigment bildete und keine Fruktose vergor, N.flava und N.perflava gerechnet. Die beiden Letztgenannten bildeten ebenfalls ein grünlich-gelbes Pigment, jedoch vergor N.flava Saccharose nicht, im Gegensatz zu N.perflava.

Alle genannten Arten wuchsen gut bei einer Temperatur von 22°C.

Wegen dieser bisher wenig einheitlichen Einteilung der Neisserien erschien eine nochmalige Untersuchung einer größeren Anzahl von Stämmen auf ihre Eigenschaften als gegeben.

Untersuchungsmethoden

Das Untersuchungsmaterial wurde aus Mundschleimhautabstrichen von Patienten und Klinikpersonal der Poliklinik der Nordwestdeutschen Kieferklinik in Hamburg ge-

wonnen. Insgesamt wurden 202 Stämme saprophytischer Neisserien gezüchtet und auf ihre Eigenschaften untersucht.

Die Abstriche wurden auf 7,5% Schafblutagarplatten (Bacto Heart Infusion Agar, Difco) ausgestrichen und zwei Tage bei 37°C bebrütet. Es wurden von einer Person immer nur zwei Kolonien von verschiedenem Aussehen und mit positiver Oxydasereaktion zur Reinzüchtung weiter überimpft.

Um Reinkulturen zu erhalten, wurde noch eine oder häufig auch zwei Passagen eingeschaltet. Die Oxydasereaktion wurde in der Reinkultur noch einmal wiederholt. Um mit Sicherheit sagen zu können, daß nur gram-negative Diplokokken weiter untersucht wurden, wurde von jedem Stamm ein nach Gram gefärbtes Präparat angefertigt.

Es wurden zunächst die Wachstumsansprüche geprüft. Eine Kolonie wurde auf Nähragar ausgestrichen und 4 Tage bei 22°C und eine weitere ebenfalls auf einer Nähragarplatte 2 Tage bei 37°C bebrütet. Eine dritte Kolonie wurde auf Schafblutagar überimpft und 4 Tage bei 22°C Zimmertemperatur beobachtet. Kolonien, bei deren Bebrütung die Temperatur entweder unter 21°C oder über 23°C lag, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ein 22°C-Brutschrank stand nicht zur Verfügung.

Zur Klärung der Frage, ob der Typ eines Stammes während mehrerer Passagen Veränderungen unterworfen ist oder

stabil bleibt und somit ein Charakteristikum dieser Art darstellt, wurden die Kolonien der Originalplatte mit denen der 1. Passage und der Reinkultur verglichen.

Zur Bestimmung des Pigments wurde die Originalplatte, der Bodensatz des zur Peroxydasereaktion notwendigen Zentrifugats und der Bodensatz einer in 40ml Glukose-Serumbouillon zwei Tage bei 37°C bebrüteten Kultur kontrolliert.

Um Hämolyse festzustellen, wurden die Kolonien auf Kaninchenblutplatten überimpft, einen Tage bei 37°C und einen weiteren bei 22°C Zimmertemperatur bebrütet. Die auf Schafblutagar gezüchteten Kolonien wurden zum Vergleich auch auf Hämolyse untersucht.

Zur Oxydasereaktion wurde eine 1% wässrige Lösung von Dimethyl-p-phenylendiamin verwendet.

Zum Nachweis von Katalase wurden die Kolonien auf Ascitesschrägagar einen Tag bei 37°C bebrütet und dann mit einer 1% H_2O_2-Lösung überschichtet.

Da zur Peroxydasereaktion eine größere Menge Bakterien zur Verfügung stehen muß, wurden die Kolonien in Nährbouillon (Heart Infusion Broth, Difco), der 1% Ascites zugesetzt war, zwei Tage bei 37°C bebrütet. Um den Bodensatz zu erhalten, wurde die Bouillon zentrifugiert und die Flüssigkeit danach abgegossen. Zu diesem Bodensatz wurden 0,5ml einer in Eisessig gesättigten Benzidinlösung gegeben und anschließend 0,5ml einer 3% H_2O_2-

Lösung. War die Benzidinreaktion positiv, trat Grün-bis Blau-Färbung auf.

Ergebnisse

Wachstumsansprüche

Auf Nähragar wuchsen bei 37°C fast alle Stämme (200/202), während auf dem gleichen Nährboden bei 22°C makroskopisch sichtbare Kolonien nur ein Drittel (37%) der Stämme ausbildete. Auch auf Blutagar wuchsen bei 22°C nur zwei Drittel (69%) in für das bloße Auge sichtbaren Kolonien. Von den restlichen Stämmen zeigte die Hälfte noch lupenfeines Wachstum. Bei diesen Ergebnissen ist zu berücksichtigen, daß von den insgesamt 202 Stämmen nur 104 ausgewertet werden konnten.

Koloniemorphologie

Auf der Originalplatte traten im wesentlichen zwei Haupttypen auf. Neben glatten, runden Kolonien (S-Form) erschienen runzlige Kolonien (R-Form), die untereinander wieder stark variierten. Entweder waren sie radiär gerunzelt mit Randwall oder unregelmäßigem Rand. Häufig hatten sie einen zirkulären Randwall mit zentralem Knopf oder waren ganz unregelmäßig gerunzelt. Sie wuchsen aber auch als runde, glattrandige Kolonien mit erhabenem Zentrum und Randwall. Weder die S-Form noch die R-Form war charakteristisch für eine bestimmte Art, häufig nicht

einmal für einen Stamm. Die Mehrzahl der Stämme (140) wuchs auf der Originalplatte in der S-Form, jedoch traten vielfach schon in der nächsten Passage einige gerunzelte Kolonien daneben auf. Weitaus häufiger aber schlugen die Stämme, die auf der Originalplatte als R-Form erschienen waren, in die S-Form um. Auf Nähragar bei 37°C zeigte sich eine besonders starke Tendenz zu glattem Wachstum.

Neben diesen beiden Haupttypen wuchsen auf der Originalplatte noch einige Stämme (10) in sehr feinen Kolonien von höchstens 0,1-0,2 mm Durchmesser ("pin point colonies"). Sie konnten aber genauso wenig als Charakteristikum für eine Art oder als stabile Form bei einem Stamm bezeichnet werden wie die beiden anderen Typen. Oft waren sie schon am zweiten Tag der Bebrütung zu normaler Größe ausgewachsen. Auf der nächsten Blutplatte wuchsen sie meistens in normalen Dimensionen.

Pigmentbildung

144 Stämme, also mehr als die Hälfte, bildeten auf der Originalplatte und der ersten Reinkultur ein organgefarbenes und gelegentlich citronengelbes Pigment. Da jedoch durch den Blutfarbstoff des Nährbodens die Erkennung des Pigments in vielen Fällen schwierig war, wurden die Kulturen in Serumbouillon zwei Tage bei 37°C bebrütet und infolge der relativ größeren Bakterienmenge,

die hierbei zur Verfügung stand, gelang der Nachweis des Pigments etwas häufiger (151). Auch im Zentrifugat der zur Peroxydasereaktion verwendeten Kulturen gelang der Nachweis des Pigments bei 151 Stämmen. Bei 7 Stämmen konnte die Frage der Pigmentbildung nicht geklärt werden.

Hämolyse

Insgesamt 83 Stämme (41%) hämolysierten, davon zeigten 55 übereinstimmendes Verhalten auf Kaninchen- und Schafblutagar. Bei 14 Stämmen trat Hämolyse nur auf Schafblutagar und in zwei Fällen nur auf Kaninchenblutagar auf. Bei 12 Stämmen war ein Vergleich nicht möglich, da hier die Kaninchenblutplatten wegen der Hinfälligkeit dieser Erythrocytenart am zweiten Tag der Bebrütung durch Hämolyse transparent ("lackfarben") geworden waren.

Cytochromoxydase

Die Oxydasereaktion wurde schon auf der Originalplatte durchgeführt und war bei allen Stämmen positiv. Bei Wiederholungsuntersuchungen der Reinkulturen ergab nur ein Stamm vorübergehend eine negative Reaktion, die übrigen reagierten regelmäßig positiv.

Peroxydase

Auch Peroxydase konnte bei allen Stämmen ohne Ausnahme nachgewiesen werden.

Katalase

Wasserstoffperoxyd zersetzten mit sieben Ausnahmen alle untersuchten Stämme. Dabei war die Reaktion mehrfach sehr heftig, in anderen Fällen weniger stark.

Diagnose und Unterscheidung der einzelnen Arten

Mit Hilfe der von BERGER gleichzeitig durchgeführten biochemischen und serologischen Untersuchungen konnten 45% der Stämme als N.sicca, 40% als N.perflava und 11,4% als N.subflava-flava bestimmt werden. Die restlichen 3,4% waren serologisch nicht zu erfassen und wurden auf Grund ihrer übrigen Eigenschaften als "Catarrhalis-Gruppe" zusammengefaßt.

Auf die für jede dieser Arten typischen Eigenschaften soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Neisseria sicca

91 Stämme von insgesamt 202 (45%) konnten als N.sicca identifiziert werden.

Auf Nähragar wuchsen bei 37°C alle Stämme. In 41 Fällen konnten die Ergebnisse bei 22°C ausgewertet werden. Nur 22 Stämme (54%) bildeten auf Nähragar bei dieser Temperatur mit bloßem Auge sichtbare Kolonien aus. 9 Stämme waren ohne Lupe nicht zu erkennen und 10 zeigten überhaupt kein Wachstum.

Auf Schafblutplatten wuchsen bei 22°C 30 Stämme (73%) makroskopisch sichtbar, 5 bildeten lupenfeines Wachstum und 6 Stämme wuchsen gar nicht. Auf der Originalplatte wuchsen 57 Stämme (63%) in glatten Kolonien und 34 (37%) in runzligen. 32 Stämme (37%) wuchsen auf Nähragar bei 37°C in runzligen Kolonien. Ausschließlich runzliges Wachstum von der Originalplatte bis zur Reinzüchtung zeigten nur 13% der Stämme.

Pigment bildeten mit Sicherheit 46 Stämme (50%), in 40 Fällen war keine Pigmentbildung vorhanden und bei 5 Stämmen war die Bestimmung unsicher.

Nur 4 Stämme (4,4%) zeigten Hämolyse, davon jedoch nur einer auf Schaf- und Kaninchenblutagar übereinstimmend. Bei den übrigen fehlte jedes Hämolysevermögen.

Oxydase und Peroxydase konnte bei allen Stämmen nachgewiesen werden. Von 9o Stämmen wurde Wasserstoffperoxyd zersetzt, nur ein Stamm besaß keine Katalase.

Es ist schwierig,abschließend die typischen Eigenschaften von N.sicca herauszustellen, da innerhalb der Art die typischen Merkmale nicht immer regelmäßig auftreten. Der Kolonietyp stellt kein charakteristisches Merkmal dar, sowie Pigmentbildung nicht als konstante Eigenschaft bezeichnet werden kann. Stämme, die keine Hämolyse hervorrufen und kein Pigment bilden, können zu N.sicca gerechnet werden.

Neisseria perflava

Diese Art wurde bei den 202 aus der Mundhöhle isolierten Stämmen nach N.sicca am häufigsten gefunden. Insgesamt gehörten 81 Stämme (40%) zu N.perflava.

Auch in dieser Gruppe wuchsen auf Nähragar bei 37°C alle Stämme, dagegen war auch hier das Wachstum bei 22°C wesentlich schlechter. Von 46 ausgewerteten Stämmen (56,8%) wuchsen zwei Fünftel der Stämme makroskopisch sichtbar auf Nähragar und drei Fünftel auf Blutagar. Von den restlichen Stämmen zeigten 15 auf Nähragar und 13 auf Blutagar lupenfeines Wachstum.

61 Stämme (76%) bildeten glatte Kolonien auf der Originalplatte aus, demnach 2o (24%) R-Kolonien. Auf den bei 37°C bebrüteten Nähragarplatten wuchsen 73/74 Stämme in glatten Kolonien. Nur 2,6% aller Stämme wuchsen auf allen Nährböden in runzligen Kolonien.

Im Zentrifugat ließ sich bei allen Stämmen Pigment nachweisen, dagegen waren auf der Originalplatte nur 78 Stämme (96%) pigmentiert.

Die Fähigkeit, Hämolyse hervorzurufen, konnte bei 76 Stämmen (94%) festgestellt werden.

Alle Stämme besaßen eine Oxydase und Peroxydase. 6 Stämme (4,9%) ließen Katalase vermissen.

In dieser Gruppe waren die spezifischen Eigenschaften leichter zu bestimmen. Typisch für N.perflava ist die

überwiegende Ausbildung glatter Kolonien, Pigmentbildung und Hämolyse.

Neisseria flava-subflava

Bisher wurden diese beiden Typen als eigene Arten beschrieben. Hier sollen sie zusammen besprochen werden. 23 Stämme (11,4%) waren in diese Gruppe einzuordnen, davon gehörten nach ihren Zuckervergärungen 9 Stämme zu N.flava und 14 zu N.subflava.

Alle Stämme wuchsen bei 37°C auf Nähragar. Jedoch zeigte sich auf den Nähr- und Blutagarplatten bei 22°C sehr schlechtes Wachstum. Von insgesamt 13 ausgewerteten Stämmen wuchsen auf Nähragar nur zwei Stämme für das bloße Auge sichtbar und auf Schafblutagar 7 Stämme. Nur vier der restlichen Stämme bildeten auf Nähragar und zwei auf Blutagar noch lupenfeines Wachstum.

Bei der Isolierung wuchsen 17 Stämme (77%) in glatten Kolonien, die übrigen 5 Stämme (23%) bildeten Kolonien vom R-Typ. Auf Blut- und Nähragarplatten erschienen alle in glatten Kolonien. Glattes Wachstum auf allen Nährboden zeigten 15 Stämme (68%).

Auf der Originalplatte waren 19 Stämme (83%) pigmentiert, und die Kontrolle des Zentrifugats ergab Pigmentbildung bei allen Stämmen.

Alle Stämme waren außerstande, Hämolyse hervorzurufen, dagegen besaßen alle eine Cytochromoxydase, Peroxydase

und Katalase.

Als regelmäßige, typische Eigenschaften von N.subflava-flava sind also zusammenfassend das Ausbleiben des Wachstums auf Nähragar bei 22°C, die starke Tendenz zur Ausbildung glatter Kolonien, Pigmentbildung und fehlendes Hämolysevermögen zu nennen.

Catarrhalis-Gruppe

Nur 6 (3%) aller untersuchten Stämme wurden unter dieser Bezeichnung zusammengefaßt.

Die Wachstumsansprüche lagen bei 4 auswertbaren Stämmen so hoch, daß sie weder auf Nähragar noch auf Blutagar bei 22°C wuchsen, sondern nur bei 37°C Kolonien ausbildeten. In der Orinialkultur fanden wir bei 5 Stämmen (83%) S-Kolonien, nur eine Kolonie wuchs in der R-Form.

Auf Kaninchenblut- und Nähragarplatten zeigten alle Stämme S-Form-Charakter und veränderten ihre Morphologie auf keinem der übrigen Nährböden.

Die Pigmentbildung war sehr unregelmäßig. Zwei Stämme erschienen auf der Originalplatte pigmentiert, jedoch bestätigte sich diese Beobachtung im Zentrifugat nicht. Ein Stamm bildete in beiden untersuchten Kulturzentrifugaten mit Sicherheit ein kräftiges Pigment, während zwei andere nur in einem der angegebenen Zentrifugate ein sehr schwaches Pigment erkennen ließen.

Hämolyse vermochte kein Stamm hervorzurufen, dagegen besaßen alle eine Cytochromoxydase, Peroxydase und Katalase.

Als einheitliche Merkmale der "Catarrhalis-Gruppe" wären zusammenfassend nur zu nennen: kein Wachstum bei einer Temperatur von 22°C auf Blut- oder Nähragar, die Neigung zu glattem Wachstum und das fehlende Hämolysevermögen.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen kann diese Gruppe nicht als einheitliche Art angesehen werden. Bei der Präzipitation mit einem N.catarrhalis-Antiserum hatte keiner der Stämme eine Reaktion gegeben.

Um einen Überblick über die spezifischen Eigenschaften jeder der oben besprochenen Arten zu bekommen, sollen diese noch einmal in einer Tabelle zusammengefaßt werden.

Eigenschaften der saprophytischen (saccharolytischen) Neisserien (195 Stämme)

Eigenschaften	N.sicca	N.perflava	N.subflava-flava
Häufigkeit i.d.Mundhöhle	45	40	11
Wachstum b.22°C makrosk.+ auf Nähragar " -	54 46	42 58	15 85
Wachstum b.22°C makrosk.+ auf Blutagar " -	73 27	57 43	54 46
Kolonietyp a.d. S Originalplatte R	63 37	76 24	77 23
Pigmentbildung	51	100	100
Hämolyse	6	93	0
Oxydase	100	100	100
Peroxydase	100	100	100
Katalase	99	93	100

Anmerkung:

Die Zahlen bedeuten Prozentwerte

Diskussion

Durch die eigenen Resultate bestätigt sich die Annahme, daß die saprophytischen Neisserien, im Gegensatz zu den pathogenen Arten, allgemein bei 22°C auf Nähragar wachsen (Bergey's Manual), nicht. Auch auf optimalen Nährboden, d.h. auf Blutagar, ist bei dieser Temperatur kein regelmäßiges Wachstum zu finden. Diese Feststellung machte allerdings auch WILSON (1928) schon. bei einer Temperatur von 37°C war allgemein gutes Wachstum festzustellen.

Die Labilität des Kolonietyps wurde schon früher beschrieben (ELSER und HUNTOON 1909, WILSON 1928, WILSON und SMITH 1928) und wird seitdem als Begründung gegen seine Verwendung als Klassifizierungsmerkmal angeführt. Auch die eigenen Stämme zeigten, mit einigen Ausnahmen, während mehrerer Passagen keine stabilen Typen. Alle beschriebenen Arten wuchsen auf der Originalplatte überwiegend in glatten Kolonien, jedoch wechselte meist schon auf der nächsten Platte die Morphologie. Als einzige Art wuchs N.catarrhalis auf allen Nährböden in glatten Kolonien. Die sog. "pin point colonies" waren auch nicht als konstante Wachstumsform zu bezeichnen. GORDON (1921) hatte sie in der Catarrhalis-Gruppe als stabilen Typ beschrieben.

Nach Topley and Wilson (1955) bilden die Neisserien nur auf festem Nährboden Pigment. Die eigenen Unter-

suchungsergebnisse bestätigten diese Beobachtungen nicht, denn auch in den flüssigen Nährboden war Pigmentbildung zu sehen. Hinsichtlich der Farbe war in keinem Fall der grünlich-gelbe Ton (INGELSHEIM 1906, GORDON 1921, WILSON und SMITH 1928) zu finden, sondern der Farbton war entweder orange oder, das jedoch sehr selten, citronengelb.

In der Literatur ist nicht sehr viel über Hämolyse saprophytischer Neisserien zu finden. 1953 wurden von BERGER einige Stämme von N.perflava als hämolysierend beschrieben. MORRIS (1954) fand bei 87 Stämmen, die er in 30 Typen einteilte, nur einen hämolysierenden Typ. Nach Bergey's Manual wurde hämolysiert N.sicca gelegentlich.

Die ebenfalls in Bergey's Manual aufgeführte N.haemolysans (THJÖTTA und BÖE 1938) wird wegen ihres abweichenden Atmungsfermentsystems nicht mehr zur Gattung Neisseria gezählt (BERGER 1960 b u. 1961 a).

Bei unseren Untersuchungen hämolysierten 83 Stämme (41%), davon zeigten 55 Stämme übereinstimmendes Verhalten auf Kaninchen- und Schafblutagar. Durch Verwendung nicht ganz frischer Kaninchenblutplatten in 12 Fällen, die am zweiten Tag der Bebrütung transparent wurden, konnte hier ein Vergleich des Hämolysevermögens auf Schafblut- und Kaninchenblutagar nicht durchgeführt werden. Doch ist anzunehmen, daß nach Beseitigung derartiger technischer

Mängel, d.h. Verwendung nur frischer Blutplatten, eine völlige Übereinstimmung zwischen Hämolyse auf Schafblut- und Kaninchenblutagar besteht.

Cytochromoxydase fand MORRIS (1954) bei 17 seiner 30 Typen nicht. Diese Stämme zeigten schon unmittelbar nach der Isolierung eine negative Oxydasereaktion.

Nur im Zusammenhang mit N.caviae (PELCZAR und Mitarbeiter 1949) wird in Bergey's Manual eine positive Oxydasereaktion erwähnt. Von WILSON und MILES (1955) wird in Übereinstimmung mit den eigenen Befunden das Vorhandensein einer Cytochromoxydase als konstantes Gattungsmerkmal angesehen, wie auch der Besitz einer Katalase nach den eigenen Ergebnissen als typische Eigenschaft der Neisserien genannt werden kann. MORRIS (1954) fand bei 11 seiner 30 Typen keine Katalase.

Nach den durchgeführten Untersuchungen ergab sich, wie schon ausgeführt, die Einteilung der oralen Neisserien in 4 Arten: N.sicca, N.perflava, N.subflava-flava und N.catarrhalis.

Diese Auffassung deckt sich weder mit der in Bergey's Manual noch mit der in Topley & Wilson's Standardwerk vertretenen. BERGEY teilt die sapsophytischen Neisserien in 8 Arten ein: N.sicca, N.perflava, N.catarrhalis, N.hämolysans, N.flavescens, N.caviae, N.subflava und N.flava.

TOPLEY und WILSON jedoch vertreten die Meinung, die

Mehrzahl der oralen Neisserien gehörten im Grunde genommen zu einer Art, die sie als Neisseria pharyngis bezeichnen; als eigene Arten werden nur N.flavescens und N.catarrhalis anerkannt.

Uns erschien einmal die Trennung von N.sicca und N.perflava wichtig, die nicht nur theoretisch, wie in Bergey's Manual, sondern auch praktisch möglich ist, sowie die Trennung von N.perflava und N.subflava-flava.

Da die positiven Merkmale bei N.sicca nicht so konstant sind wie bei N.perflava, läßt sich die Diagnose, wenn keine Antisera verfügbar sind, nur auf Grund fehlender Eigenschaften stellen. Demnach sind mit Sicherheit die nicht hämolysierenden, pigmentfreien Stämme zu N.sicca zu rechnen. Die Diagnose: "N.sicca" nach Bergey's Manual, d.h. auf Grund der runzligen Wachstumsform bei fehlender Pigmentbildung, wäre bei unseren Untersuchungen nur bei 15% der zu N.sicca zählenden Stämme gelungen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind N.perflava und N.subflava-flava als zwei verschiedene Arten anzusehen und können nicht, wie bei Topley & Wilson, als N.pharyngis zusammengefaßt werden. Die Gründe dafür liegen in den Unterschieden, die durch die biochemischen und serologischen Untersuchungen hervortraten. Zudem fehlt N.subflava-flava die Fähigkeit zu hämolysieren, und sie ist in der Kultur anspruchsvoller, da sie so gut wie gar nicht bei 22°C wächst.

76 Stämme (94%) von N.perflava hämolysierten. Bei diesem Ergebnis ist zu berücksichtigen, daß 3 der 5 anhämolytischen Stämme im Protokoll aufeinander folgen und kurz hintereinander untersucht wurden. Es besteht die Möglichkeit, daß hier eine ungeeignete Blutcharge verwendet wurde. Bedauerlicherweise war eine Kontrolle auf den Kaninchenblutplatten nicht möglich, da diese am zweiten Tag der Bebrütung transparent geworden waren. Einer dieser Stämme war serologisch nicht zu erfassen. So kann also mit Sicherheit nur ein Stamm als nicht hämolysierend bezeichnet werden.

Die Seltenheit der zur Catarrhalis-Gruppe gehörenden Stämme (3%) erscheint merkwürdig im Vergleich mit den Angaben älterer Autoren (GHON und PFEIFFER 1902, v.LINGELSHEIM 1906, GORDON 1921), von denen v.LINGELSHEIM sie praktisch in jedem Nasen-Rachenraum gefunden hat.

GORDON (1921) hatte schon darauf hingewiesen, daß es sich hier um eine nicht ganz homogene Gruppe von Stämmen handelt. Die eigenen Pigmentbefunde stimmten mit den von GORDON gemachten Erfahrungen (er hatte vereinzelt gelb-pigmentierte Stämme gefunden) überein.

Eine gewisse Einheitlichkeit zeigte die Gruppe in ihrer Tendenz zu glattem Wachstum.

Der erstmals von GHON und PFEIFFER (1902) und dann immer wieder beschriebene Kolonietyp, für den der unregelmäßige, wie "angefressen" erscheinende Rand typisch

sein sollte, konnte an unseren Stämmen nicht bestätigt werden.

Zusammenfassung

Es wurden 202 Stämme saprophytischer Neisserien aus der Mundhöhle isoliert und auf ihre Wachstumsansprüche, Koloniemorphologie, Pigmentbildung, ihr hämolysevermögen und ihre Fähigkeit Oxydase, Peroxydase und Katalase zu bilden untersucht.

Es ergab sich eine Einteilung in 4 Arten: 45% gehörten zu N.sicca, 40% zu N.perflava, 11% zu N.subflava-flava (4% N.flava, 7% N.subflava) und 3 % zur Catarrhalis-Gruppe. Ein Stamm konnte nicht eingeordnet werden.

Diese Einteilung war möglich auf Grund der spezifischen Reaktionen der einzelnen Arten. Die Unterscheidungsmöglichkeiten wurden angegeben und die Ergebnisse denen anderer Autoren gegenübergestellt.

Literatur

BERGER, U.: Überhämolysierende Stämme saprophytischer Neisserien. Arch. Hyg. (Berl.) 137, 499 (1953)

BERGER, U.: Neisseria haemolysans (THJÖTTA und BÖE 1938): Untersuchungen zur Stellung im System. Z. Hyg. Infekt.-Kr. 146, 253 (1960 b).

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7.Aufl. Baltimore 1957.

ELSER, W.J., and F.M. HUNTOON: Studies on meningitis. J.med.Res. 20, 371 (1909).

GHON, A., u.H. PFEIFFER: Der Mikrococcus catarrhalis (R. PFEIFFER) als Krankheitserreger. Z.klin.Med. 44, 262 (1902).

GORDON, J.E.: The gram-negative cocci in "colds" and influenza. Influenza studies VII. J. infect. Dis. 29, 462 (1921).

LINGELSHEIM, W.v.: Die bakteriologischen Arbeiten der Kgl. Hygienischen Station zu Beuthen O.-Schl. während der Genickstarre-Epidemie in Oberschlesigen im Winter 1904/05. Klin. Jb. 15, 373 (1906).

MORRIS, E.O.: The bacteriology of the oral cavity. IV. (A) Micrococcus, (B) Neisseria and (C) Veillonella. Brit. dent. J. 96, 259 (1954).

PELCZAR, M.J., J.P. HAJEK and J.E. FABER: Characterization of Neisseria isolated from the pharyngeal region of guinea pigs. J. infect. Dis. 85, 239 (1949)

THJÖTTA, T. and J. BÖEß Neisseria haemolysans, A hemolytic species of Neisseria Trevisan. Acta path. microbiol. scand., Suppl. 37, 527 (1938)

WILSON, G.S., and A.A. MILES: Topley and Wilson's Priciples of Bacteriology and Immunity, 4. Aufl. London 1955.

WILSON, G.S. and M.M. SMITH: Observations on the gram-negative cocci of the nasopharynx, with a description of Neisseria pharyngis. J. Path.Bact. 31, 597 (1928).

WILSON, S.P.: An investigation of certain gram-negative cocci met with in the masopharynx, with special reference to their classification. J.Path. Bact. 31, 477 (1928).

Lebenslauf

Ich, Brigitte Böger, wurde am 30. Januar 1935 als Tochter des Studienrates Hellmuth Wulff und seiner Ehefrau Anni in Hamburg geboren.

Nach Abschluß der Reifeprüfung am Gymnasium für Mädchen am Lerchenfeld in Hamburg 1954 begann ich mit dem Wintersemester 1954/55 in Heidelberg moderne Sprachen zu studieren.

Im Sommersemester 1955 wechselte ich die Fakultät und begann in Hamburg das Studium der Zahnheilkunde.

Hier legte ich am 28. Oktober 1960 das zahnärztliche Staatsexamen ab.

Jetzt führe ich in Hamburg-Gr.Flottbek eine eigene Praxis.

Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Berger
danke ich für die freundliche
Überlassung des Themas und die
wertvollen Hinweise für meine
Arbeit.